

5

n variant de 1 à environ 4, ou provient du pyridoxalsulfate, du pyridoxalphosphate, de l'adénosine triphosphate, de la phosphotyrosine, de la phosphosérine, de l'inositolhexaphosphate et ses dérivés, d'acide polycarboxylique contenant de 2 à 10 atomes de carbone sur la chaîne principale, de l'acide benzénecarboxylique comportant au moins trois fonctions carboxyliques, du 2,3 diphosphoglycérate.

10 Une autre classe avantageuse de composés selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels aucune liaison ionique et aucune liaison covalente n'est susceptible de s'établir ailleurs qu'entre les groupes respectifs appropriés des sites Z du polymère et l'hémoglobine.

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine sont établies à partir des groupes  
15 carboxyliques provenant des sites Z fixés sur le polymère et des groupes NH<sub>2</sub> de l'hémoglobine.

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels les liaisons ioniques entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre les groupes carboxylates des sites Z et l'hémoglobine.

20 Tout ce qui a été dit à propos des conjugués macromoléculaires obtenus à partir du nouveau procédé décrit ci-dessus, s'applique notamment aux conjugués macromoléculaires de l'invention.

Les nouveaux conjugués macromoléculaires selon l'invention peuvent être obtenus soit à partir d'un procédé mettant en oeuvre l'oxyhémoglobine, soit à partir d'un procédé mettant en oeuvre la déoxyhémoglobine.

Les conjugués d'hémoglobine selon l'invention peuvent être obtenus de la façon suivante :

25 - on fixe, dans une première étape, des sites Z comportant les groupes ioniques destinés à créer une liaison ionique avec l'hémoglobine sur un polymère P, dans le rapport suivant :

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les onze monomères,

30 - lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un carboxylate, non engagé dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,

35 - lorsqu'il s'agit de site Z contenant deux charges anioniques provenant de deux carboxylates non engagés dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les six monomères,

le polymère P étant hydrosoluble, non toxique, de préférence non antigénique, hémocompatible, de masse moléculaire d'environ 1 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 1 000 à environ 100 000, comportant des groupes polaires, de préférence des groupes hydroxyles, carboxyliques ou amines, et les sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par des groupes, sulfates et/ou phosphates et/ou  
40 carboxylates, et contenant d'autre part au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH,

. soit en utilisant un composé Z-Y dans lequel Y est une fonction active ou activable, telle que aldéhyde, carboxylique, amine, hydroxyle ou halogène, ou bien

. soit en effectuant un greffage radicalaire des sites Z sur le polymère P ;

45 - puis dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans un milieu non déoxygéné, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygénée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z portés par le polymère  
50 et l'hémoglobine,

- lorsque la réaction ci-dessus indiquée conduit éventuellement à des fonctions imines, celles-ci peuvent être stabilisées en fonctions amines, par exemple par réduction à l'aide de NaBH<sub>4</sub>, NaCNBH<sub>2</sub>, le diméthylaminoborane ou HCOOH.

55 Les conjugués selon l'invention peuvent également être obtenus selon le procédé décrit dans la demande France n° 86.09625.

Les conjugués d'hémoglobine liés irréversiblement à des polymères polyanioniques préparés selon l'invention peuvent, lorsqu'ils sont dissous dans des solutions aqueuses de composition convenable, jouer le rôle de substituts du sang, notamment dans des interventions nécessitant des transfusions ou la perfusion d'organe.

60 L'invention vise par conséquent, également les solutions aqueuses renfermant les conjugués décrits ci-dessus et notamment les solutions rendues isotoniques du sang, par dialyse prolongée contre une solution de Tyrode ( de composition NaCl 8 g/l ; KCl 0,2 g/l ; CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/l ; MgCl<sub>2</sub> 0,1 g/l ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 g/l ; NaHCO<sub>3</sub> 1 g/l ; D.glucose 1 g/l) par exemple et concentration par ultrafiltration jusqu'à obtenir pour l'hémoglobine, une concentration d'environ 7 %.

65 Des préparations de conjugués macromoléculaires d'hémoglobine obtenus selon l'invention, ont été

examinées en tant que transporteurs d'oxygène potentiels. On a pu montrer qu'elles sont effectivement capables de fixer l'oxygène réversiblement et en particulier de le restituer plus facilement que l'hémoglobine libre. Il apparaît en effet, que ces préparations sont caractérisées par des pressions de demi-saturation ( $P_{50}$ ) qui peuvent être très élevées (de 900 à 5 000 Pa) alors que dans les mêmes conditions (NaCl 0.05 M, pH 7, 25°C) celle de l'hémoglobine native est égale à environ 430 Pa.

Ainsi ces conjugués peuvent être utilisés pour fournir à des tissus ischémisés des quantités d'oxygène importantes. Ils peuvent également être utilisés en transfusion et être administrés à des patients, sous forme d'une solution aqueuse rendue isotonique du sang, en présence ou non d'excipients. Les composés peuvent aussi être lyophilisés en présence ou non d'un cryoprotecteur ou atomisés, et être redissous dans l'eau avant utilisation.

Les conjugués macromoléculaires selon l'invention ont été testés relativement à la toxicité aiguë.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent ci-après donnés à titre non limitatif.

**EXEMPLE 1 :** Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de dextrane-benzène-pentacarboxylate (M.M du dextrane 40 000). Couplage avec l'oxyhémoglobine.

Du dextrane aminé contenant  $5 \cdot 10^{-4}$  moles de  $\text{NH}_2$  par g de produit sec (soit 8 moles de  $\text{NH}_2$  pour 100 moles de glucopyranose) est préparé selon P. HUBERT et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75, 3143, par action de l'ammoniaque sur du dextrane activé à l'épichlorhydrine.

1 g de ce dextrane aminé est dissous dans 20 ml d'eau et le pH est ajusté à 6,5 avec HCl 0.1N. On ajoute ensuite 1,7 g d'acide benzène hexacarboxylique, puis 1 g de chlorhydrate de N'-éthyl-N-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI). Le pH est ramené à 6,5 et la réaction est poursuivie pendant 3 jours à 20° C. Après dialyse contre une solution d'acétate de sodium 0,5 M, le mélange est traité à l'anhydride acétique pour bloquer les fonctions amines non substituées du dextrane. La solution est alors épurée des contaminants de petite masse moléculaire par dessalage sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (IBF-France) avec un tampon phosphate 0,2 M, pH 7,2.

Après une dialyse prolongée contre de l'eau, la solution contenant le polymère polyanionique est lyophilisée. Le composé est conservé au froid sous vide.

Le polycarboxylate de dextrane obtenu contient  $2 \cdot 10^{-4}$  moles de benzène-pentacarboxylate (B.P.C.) par g de polymère.

5 g du polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 250 ml de NaCl 0,05 M. On ajuste le pH à 7 avec de la soude 0.1M et on ajoute 150 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %. On ajoute ensuite 600 mg de chlorhydrate de N'-éthyl-N-(3-diméthyl-aminopropyl) carbodiimide (EDCI) et la réaction est poursuivie à 20° C pendant 2 heures. On vérifie qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre sur le chromatogramme obtenu sur une colonne d'Ultrogel AcA 34 (IBF France). La  $P_{50}$  du conjugué est de 2660 Pa. (25° C, Tris 0,05 M, pH = 7,2 ; Hb libre dans les mêmes conditions :  $P_{50}$  = 430 Pa).

**EXEMPLE 2 :** Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de dextrane-benzène-pentacarboxylate (M.M du dextrane 10 000). Couplage avec l'oxyhémoglobine.

Le polymère est préparé à partir d'un dextrane aminé contenant  $4 \cdot 10^{-4}$  moles de  $\text{NH}_2$  par g de produit sec, préparé de la même façon que celui de l'exemple 1.

1 g de ce dextrane aminé est dissous dans 20 ml d'eau et le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 0,1M.

On ajoute ensuite 0,7 g d'acide benzène hexacarboxylique (B.H.C.) puis 1 g de chlorhydrate de N'-éthyl-N-(3-diméthyl-aminopropyl) carbodiimide (EDCI). La réaction est poursuivie pendant 1 jour à 20° C. Après dialyse contre une solution d'acétate de sodium 0,5 M le mélange est traité à l'anhydride acétique pour bloquer les fonctions amines non substituées du dextrane. La solution est alors épurée des contaminants de petite masse moléculaire par dessalage sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (IBF France) avec un tampon phosphate 0,2 M, pH = 7,2. On vérifie par chromatographie liquide haute performance à l'aide d'une colonne TSK G 3000 SW (LKB France) que le polycarboxylate de dextrane est totalement épuré du benzène hexacarboxylate en excès.

Après une dialyse prolongée contre de l'eau la solution contenant le polymère polyanionique est lyophilisée. Le composé est conservé au froid sous vide. Le polycarboxylate de dextrane obtenu contient  $3,5 \cdot 10^{-4}$  moles de B.P.C. par g de polymère.

2,5 g de polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 150 ml de NaCl aqueux 0,05 M. On ajoute 100 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %. On ajuste le pH à 7,5 avec de la soude 0,1 M et on complète à 300 ml avec NaCl aqueux 0,05 M.

On ajoute ensuite 350 mg d'EDCI et la réaction est poursuivie à 20° C pendant 2 heures. On vérifie qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre sur le chromatogramme obtenu sur une colonne TSK G 3000 SW (LKB France).

La Figure 2 représente la densité optique en fonction du volume d'élution et permet de constater qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre. Sur cette figure,  $V_0$  correspond au volume exclus de la colonne et la flèche sous Hb correspond au volume d'élution de l'hémoglobine libre, c'est-à-dire non couplée au polymère.

La  $P_{50}$  du conjugué est de 2720 Pa. (25° C, Tris 0,05M, pH = 7,2 ; Hb libre dans les mêmes conditions :  $P_{50}$  = 430 Pa).



EXEMPLE 3 : Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de dextrane-benzènetricarboxylate (M.M du dextrane 10 000). Couplage à l'oxyhémoglobine.

Le polymère est préparé à partir d'un dextrane aminé contenant  $4 \cdot 10^{-4}$  moles de  $\text{NH}_2$  par g de polymère sec.

1 g de ce polymère aminé est dissous dans 20 ml d'eau et le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 0,1M. On ajoute ensuite 0,5 g d'acide benzène 1,2,4,5-tétracarboxylique (B.T.C) puis 0,6 g d'EDCI. La réaction est poursuivie pendant 1 jour à 20°C. La solution est alors traitée comme dans l'exemple 2.

Le polycarboxylate de dextrane obtenu contient  $3,2 \cdot 10^{-4}$  moles de benzenetricarboxylate par g de polymère.

0,5 g de ce polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 25 ml de NaCl aqueux 0,05 M. On ajoute 10 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %. On ajuste le pH à 7,5 avec de la soude 0,1M et on complète à 40 ml avec NaCl aqueux 0,05 M.

On ajoute ensuite 50 mg d'EDCI et la réaction est poursuivie à 20°C pendant 2 heures. On vérifie qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre sur le chromatogramme obtenu sur une colonne TSK G 3000 SW (LKB France). La Figure 3 représente la densité optique en fonction du volume d'élution et permet de constater qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre. Sur cette figure, la flèche sous  $V_0$  correspond au volume exclus de la colonne et la flèche sous Hb correspond au volume d'élution de l'hémoglobine libre, c'est-à-dire non couplée.

La  $P_{50}$  du conjugué est de 710 Pa (25°C, Tris 0,05 M, pH = 7,2 ; Hb libre dans les mêmes conditions,  $P_{50} = 430$  Pa).

EXEMPLE 4 : Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine est dextrane-butanetricarboxylate (M.M du dextrane 10 000). Couplage à l'oxyhémoglobine.

Le polymère est préparé de la même façon que celui de l'exemple 3 en utilisant l'acide n-butane 1,2,3,4-tétracarboxylique (Bu.T.C.). Le polycarboxylate de dextrane obtenu contient  $4 \cdot 10^{-4}$  moles de butanetricarboxylate par g de polymère.

0,6 g de ce polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 25 ml de NaCl aqueux 0,05 M. On ajoute 10 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %. On ajuste le pH à 7,5 avec de la soude 0,1 M et on complète à 40 ml avec NaCl aqueux 0,05 M.

On ajoute ensuite 70 mg d'EDCI et la réaction est poursuivie à 20°C pendant 2 heures. On vérifie qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre sur le chromatogramme obtenu sur une colonne TSK G 3000 SW (LKB France). La  $P_{50}$  du conjugué obtenu est 540 Pa. (25°C, Tris 0,05 M, pH = 7,2 ; hémoglobine libre dans les mêmes conditions,  $P_{50} = 430$  Pa).

EXEMPLE 5 : Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de monométhoxypolyoxyéthylène-benzène pentacarboxylate (M.M du polyoxyéthylène : 5000. Couplage avec l'oxyhémoglobine.

Du monométhoxypolyoxyéthylène aminé, (MPOE- $\text{NH}_2$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  moles de  $\text{NH}_2$  par g de produit sec) est préparé selon M. LEONARD et al, Tetrahedron 1984, 40, 1581, par action du bromure de thionyle sur du MPOE, suivie d'une substitution par l'ammoniac.

2 g de ce MPOE- $\text{NH}_2$  sont dissous dans 50 ml d'eau et le pH est ajusté à 8. On ajoute ensuite 1,4 g d'acide benzène hexacarboxylique (B.H.C), puis 0,8 g de chlorhydrate de N'-éthyl-N (3-diméthyl-aminopropyl) carbodiimide (EDCI). On laisse la réaction se poursuivre une nuit à température ambiante. Le mélange est ensuite acidifié à pH 1 par HCl aqueux 1M ; le polymère est extrait au chlorure de méthylène, puis précipité par l'éther anhydre.

Il est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de Dowex, et ensuite sur colonne d'Ultrogel d'AcA 202 (IBF, France). L'éluat est dialysé contre de la soude aqueuse (pH 9), puis le polymère est lyophilisé.

0,2 g de ce polymère contenant environ  $1,5 \cdot 10^{-4}$  moles de benzène-pentacarboxylate (B.P.C) par g de polymère sont dissous dans 10 ml d'eau. On ajuste le pH à 7 et on ajoute 10 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %, puis 10 mg d'EDCI. Après une heure de réaction, le mélange est chromatographié sur colonne d'Ultrogel AcA 54 (IBF, France) afin de purifier le conjugué polymère d'hémoglobine. La figure 4 correspond à la variation de la densité optique en fonction du volume d'élution et permet de constater qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre.  $V_0$  correspond au volume exclus de la colonne ; la flèche sous Hb correspond au volume d'élution de l'hémoglobine libre, c'est-à-dire non couplée, et celle sous MPOE-BPC correspond au volume d'élution du polymère non lié à l'hémoglobine. La  $P_{50}$  de ce conjugué est de 2400 Pa (25°C, Tris 0,05 M, pH 7,2 ; Hb libre dans les mêmes conditions ;  $P_{50} = 430$  Pa).

#### EXEMPLE 6

Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de dextrane-benzènedicarboxylate (MM du dextrane 10 000 : liaison ester entre le dextrane et le site polycarboxylate). Couplage à l'oxyhémoglobine.

Le dextrane-benzènedicarboxylate est préparé en faisant réagir 7,5g de benzène 1,2,4 tricarboxylique anhydride avec 32 g de dextrane en milieu aqueux à pH 9 pendant 15 h ; La solution est ensuite débarrassée de l'acide benzène 1,2,4 tricarboxylique résiduel par dessalage sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (IBF-France) avec un tampon phosphate 0,2M, pH 7,2.

Après une dialyse prolongée contre de l'eau, la solution contenant le polymère est lyophilisée. le polycarboxylate de dextrane contient  $6,3 \cdot 10^{-4}$  moles de benzènedicarboxylate (B.D.C) par g de polymère.

Ceci correspond à environ 1 site Z comportant deux groupes anioniques constitués de deux groupes carboxylates tous les 10 monomères.

11 g de polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 250 ml d'eau. On ajuste le pH à 6.5 et on ajoute 150 ml d'une solution d'hémoglobine à 10 %. On ajoute ensuite 160 mg de chlorhydrate de N'-éthyl-N (3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) et la réaction est poursuivie à 20°C pendant 2 heures.

Le conjugué d'hémoglobine obtenu est un conjugué nouveau.

Le mélange est chromatographié sur Ultrogel AcA 54 (IBF France) pour éliminer l'hémoglobine libre et les contaminants. La  $P_{50}$  du conjugué purifié est de 870 Pa (25°C, Tris 0.05M, pH 7.2; Hb libre dans les mêmes conditions:  $P_{50} = 430$  Pa).

#### EXEMPLE 7:

Synthèse d'un conjugué covalent d'hémoglobine et de dextrane-benzènetricarboxylate (MM du dextrane 10 000 - liaison ester entre le dextrane et le site polycarboxylate). Couplage à l'oxyhémoglobine.

Le dextrane-benzènetricarboxylate est préparé en faisant réagir 26 g de benzène 1,2,4,5 tétracarboxylique dianhydride avec 20 g de dextrane en milieu aqueux à pH 9 pendant 15 h; La solution est ensuite débarrassée de l'acide benzène 1,2,4,5 tetracarboxylique résiduel par dessalage sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (IBF-France) avec un tampon phosphate 0,2M, pH 7.2.

Après une dialyse prolongée contre de l'eau, la solution contenant le polymère est lyophilisée. Le polycarboxylate de dextrane contient  $1,15 \cdot 10^{-3}$  moles de benzènetricarboxylate (B.T.C.) par g de polymère.

5 g de polycarboxylate de dextrane sont dissous dans 250 ml d'eau. On ajuste le pH à 7.0 et on ajoute 150 ml d'une solution d'hémoglobine à 10%. On ajoute ensuite 120 mg de chlorhydrate de N'-éthyl-N(3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) et la réaction est poursuivie à 20°C pendant 2 heures.

Le mélange est chromatographié sur Ultrogel AcA 54 (IBF France) pour éliminer l'hémoglobine libre et les contaminants. La  $P_{50}$  du conjugué purifié est de 2000 Pa (25°C, Tris 0,05M, pH 7.2; Hb libre dans les mêmes conditions:  $P_{50} = 430$  Pa).

On peut également préparer le conjugué défini ci-dessus à l'aide de dextrane et d'acide benzène 1,2,4,5 tétracarboxylique, en présence de carbodiimide soluble dans l'eau tel que le chlorhydrate de N'-éthyl-N(3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI).

#### EXEMPLE 8:

On prépare, selon le protocole décrit dans l'exemple 5, les conjugués :

- . d'hémoglobine et de polyéthylèneglycol-benzènepentacarboxylique
- . d'hémoglobine et de polyéthylèneglycol benzenetétracarboxylique
- . d'hémoglobine et de polyéthylène-glycol-benzènetricarboxylique
- . d'hémoglobine et de polyéthylèneglycol-benzène-dicarboxylique.

#### EXEMPLE 9:

On prépare, selon le protocole décrit dans les exemples 6 et 7, le conjugué d'hémoglobine et de polyéthylèneglycol-benzènetricarboxylique.

Pour préparer le polyéthylèneglycol-benzènetricarboxylique, on fait réagir du benzène-tétracarboxylique dianhydride avec du polyéthylèneglycol en milieu organique, tel que diméthylformamide. La solution est ensuite débarrassée de l'acide benzène tetracarboxylique résiduel par exemple par dessalage sur une colonne d'Ultrogel AcA 202 (IBF-France) avec un tampon phosphate 0,2M, pH 7.2.

Après une dialyse prolongée contre de l'eau, la solution contenant le polymère est lyophilisée.

Le polycarboxylate de polyéthylèneglycol est dissous dans de l'eau. On ajuste le pH à 7.0 et on ajoute une solution d'hémoglobine, par exemple à 10%. On ajoute ensuite du chlorhydrate de N'-éthyl-N(3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) et la réaction est poursuivie à 20°C pendant 2 heures.

Le mélange est chromatographié sur Ultrogel AcA 54 (IBF France) pour éliminer l'hémoglobine libre et les contaminants.

On prépare également selon le protocole indiqué précédemment, le conjugué d'hémoglobine et de polyéthylèneglycol-benzène-dicarboxylique (à l'aide de polyéthylèneglycol et de benzène 1,2,4 tricarboxylique anhydride).

On peut également préparer des polyéthylèneglycols - benzènepolycarboxylates en faisant réagir les acides benzènepolycarboxyliques sur les fonctions OH du polymère en présence de dicyclohexylcarbodiimide/diméthylaminopyridine dans le diméthylformamide.

#### EXEMPLE COMPARATIF 1 :

Cet exemple a pour but de comparer la  $P_{50}$  obtenue en mettant en oeuvre le procédé de l'invention pour préparer des conjugués d'hémoglobine dans lesquels la liaison covalente est établie entre un groupe aldéhyde non porté par le site Z sur lequel se trouve le groupe anionique phosphate.

On prépare du phosphate de dextrane à l'aide de dextrane de départ de masse moléculaire d'environ 10 000 que l'on transforme en phosphate disodique contenant 80% de phosphore, conformément au protocole décrit dans l'exemple 1 de la demande France n°86.09625.

On active le phosphate de dextrane par le périodate de sodium de façon à obtenir 13 aldéhydes pour 100 unités glucosidiques.

Ce dextrane phosphate aldéhydique est mis à réagir avec l'hémoglobine dans la proportion 1.5 en masse



(masse de dextrane / masse d'hémoglobine), à pH 8; Or la réaction est poursuivie à 4°C pendant 24 h. On ajoute alors une solution de NaBH<sub>4</sub> dans NaOH 10<sup>-3</sup>N. Le mélange est chromatographié pour contrôler qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre (HPLC sur colonne TSK G 3000 SW Beckman).

Quand la réaction est faite sur la déoxyhémoglobine selon le procédé décrit dans la demande France n° 86.09625, la P<sub>50</sub> du conjugué d'hémoglobine est de 3380 Pa (25°C, Tris 0,05 M, pH 7.2).

Dans les mêmes conditions, la P<sub>50</sub> de l'hémoglobine libre est de 450 Pa.

Quand la réaction est faite sur l'oxyhémoglobine, conformément au procédé de la présente invention, la P<sub>50</sub> du conjugué d'hémoglobine est de 425 Pa (25°C, Tris 0,05 M, pH 7.2).

Dans les mêmes conditions, la P<sub>50</sub> de l'hémoglobine libre P<sub>50</sub> est de 430 Pa.

Cet exemple comparatif montre que le procédé de préparation de conjugués d'hémoglobine à l'aide d'hémoglobine oxygénée n'est pas applicable lorsque la liaison covalente est établie entre un groupe aldéhyde (carboxylique ou OH) non fixé sur le site Z comportant les charges anioniques.

## 15 Revendications

1. Procédé de préparation de conjugués macromoléculaire hydrosolubles d'hémoglobine, non biodégradables ou peu biodégradables, pendant le temps durant lequel le conjugué macromoléculaire doit assurer des fonctions oxyphoriques dans la plasma, présentant pour l'oxygène une affinité inférieure à celle de l'hémoglobine libre, caractérisé en ce que :

- on fixe, dans une première étape, des sites Z sur un polymère P, à raison d'au moins un site Z par chaîne de polymère, le polymère P étant hydrosoluble, non toxique, de préférence non antigénique, hémocompatible, de masse moléculaire d'environ 1 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 1 000 à environ 100 000, comportant un ou plusieurs groupes polaires, de préférence des groupes hydroxyles, carboxyliques ou amines, et les sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par des groupes, sulfates et/ou phosphates et/ou carboxylates et destinée à créer une liaison ionique avec l'hémoglobine, et contenant d'autre part au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH, destiné à créer une liaison covalente avec l'hémoglobine,

. soit en utilisant un composé Z-Y dans lequel Y est une fonction active ou activable à l'aide d'un agent d'activation, telle que aldéhyde, carboxylique, amine, hydroxyle ou halogène, ou bien

. soit en effectuant un greffage radicalaire des sites Z sur le polymère P;

- puis dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous oxygénée dans un milieu non déoxygéné, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygénée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine,

- lorsque la réaction ci-dessus indiquée conduit éventuellement à des fonctions imines, celles-ci peuvent être stabilisées en fonctions amines, par exemple par réduction à l'aide de NaBH<sub>4</sub>, NaCNBH<sub>3</sub>, le diméthylaminoborane ou HCOOH.

2. Procédé de préparation de conjugués macromoléculaires selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on fixe les sites Z sur le polymère P de telle sorte que la relation entre le nombre et la nature des charges négatives destinés à créer une liaison ionique entre un site et l'hémoglobine (non engagées dans la liaison entre un site et le polymère et non engagées dans la liaison covalente entre un site et l'hémoglobine) soit la suivante :

- lorsque chaque site Z contient un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z tous les dix monomères du polymère,

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant au moins deux groupes anioniques, constitués de sulfates et/ou de phosphates, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,

- lorsque chaque site Z contient des charges anioniques provenant de carboxylates, il faut au moins deux groupes carboxylates sur un même site Z, et au moins un tel site Z tous les cinq monomères,

- lorsque l'un au moins des sites Z contient au moins trois charges négatives provenant de carboxylates, il y a au moins un tel site par chaîne de polymère.

3. Procédé de préparation de conjugués macromoléculaires selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on fixe les sites Z sur le polymère P de telle sorte que la relation entre le nombre et la nature des charges négatives destinés à créer une liaison ionique entre un site et l'hémoglobine (non engagées dans la liaison entre un site et le polymère et non engagées dans la liaison covalente entre un site et l'hémoglobine) soit la suivante :

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un site Z tous les onze monomères,

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un carboxylate, non engagé dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant deux charges anioniques provenant de deux carboxylates non engagés dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les six monomères.

4. Procédé selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH porté par les sites Z et au moins une amine de l'hémoglobine située dans le site allostérique de l'hémoglobine lorsque celle-ci est sous forme déoxygénée, notamment l'amine de l'une au moins des deux valines  $\beta$ -terminales de l'hémoglobine.

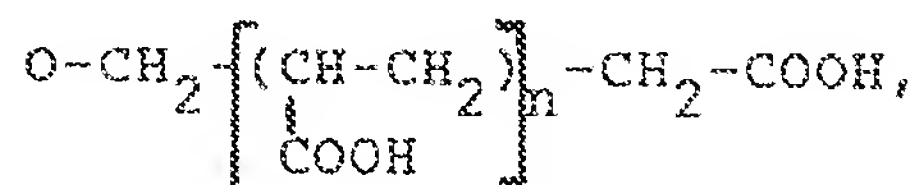
5. Procédé selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les ponts salins entre les groupes  $\text{NH}_3^+$  et les groupes  $\text{COO}^-$  internes de l'hémoglobine sont intacts lorsque l'hémoglobine est sous forme déoxygénée.

6. Procédé selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le polymère P est choisi parmi les polysaccharides, notamment les hydroxyalkylamidons dont la radical alkyle comporte de 2 à 4 atomes de carbone, l'inuline, le dextrane et ses dérivés, notamment le dextrane aminé, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthacrylate et ses dérivés, les polypeptides, les polyalkylène glycols dans lesquels le groupe alkylène comporte de 2 à 5 atomes de carbone, notamment le polyéthylène glycol et le polypropylène glycol.

7. Procédé selon les revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le polymère P a une masse moléculaire moyenne inférieure ou égale à 70 000, lorsqu'il est constitué par le dextrane et ses dérivés, et une masse moléculaire inférieure ou égale à 10 000 lorsqu'il est choisi parmi les polyalkylène glycols, la polyvinylpyrrolidone ou le polyméthylacrylate.

8. Procédé selon les revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le site Z est relié au polymère par l'intermédiaire d'une fonction ester, éther, amide ou amine.

9. Procédé selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le site Z comporte les groupes  $\text{OSO}_3\text{H}$ ,  $\text{OPO}_3\text{H}_2$ ,  $\text{O-CH}(\text{COOH})_2$ ,  $\text{-O-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ,



n variant de 1 à environ 4, ou provient du pyridoxalsulfate, du pyridoxalphosphate, de l'adénosine triphosphate, de la phosphotyrosine, de la phosphosérine, de l'inositolhexaphosphate et ses dérivés, d'acide polycarboxylique contenant de 2 à 10 atomes de carbone sur la chaîne principale, de l'acide benzènegarboxylique comportant au moins trois fonctions carboxyliques, du 2,3 diphosphoglycérate.

10. Procédé selon les revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine sont établies à partir des groupes carboxyliques provenant des sites Z fixés sur le polymère et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

11. Procédé selon les revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les liaisons ioniques entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre les groupes carboxylates des sites Z et l'hémoglobine.

12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir de dextrane aminé de masse moléculaire d'environ 40 000, et d'environ  $2 \cdot 10^{-4}$  moles d'acide benzenhexacarboxylique par g de dextrane,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenepentacarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenhexacarboxylique,

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenhexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

13. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir du dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ  $3,5 \cdot 10^{-4}$  moles d'acide benzenhexacarboxylique par g de dextrane,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenepentacarboxylate fixés sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenhexacarboxylique,

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenhexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir de dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ  $3,2 \cdot 10^{-4}$  moles de benzenetetracarboxylique par g de dextrane,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenetricarboxy-



late fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenetetracarboxylique,

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenetetracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

15. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir de dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ  $4 \cdot 10^{-4}$  moles de butane tetracarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du butanetricarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide butanetetracarboxylique

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide butanetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide butanetetracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

16. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir de monométhoxypolyoxyéthylène aminé, de masse moléculaire d'environ 5 000, et d'environ  $1.5 \cdot 10^{-4}$  moles de benzenhexacarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenepentacarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenhexacarboxylique

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenhexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

17. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est obtenu à partir de dextrane, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ  $1.15 \cdot 10^{-3}$  moles de benzène-1,2,4,5 tetracarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzènetricarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzène-1,2,4,5 tetracarboxylique

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzènetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzène-1,2,4,5 tetracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine.

18. Procédé selon les revendications 1 à 17, caractérisé en ce que à l'issue de la première étape, le polymère comportant les sites Z est activé avant d'être mis en réaction avec l'hémoglobine.

19. Procédé selon les revendications 1 à 18, caractérisé en ce que l'activation consiste à transformer les fonctions OH en groupes aldéhydes, par exemple par oxydation périodique.

20. Procédé selon les revendications 1 à 19, caractérisé en ce que l'activation des sites Z du polymère et sa mise en réaction avec l'hémoglobine sont pratiquement simultanées.

21. Procédé selon les revendications 1 à 20, caractérisé en ce que les sites Z du polymère :

- sont activés par exemple à l'aide de carbonyldiimidazole, lorsque les sites Z ne comportent pas de groupes aldéhydes, mais qu'ils contiennent des fonctions hydroxyliques,

- ou bien sont activés à l'aide de réactifs utilisés en synthèse peptidique, lorsque les sites Z comportent des groupes carboxyles.

22. Procédé selon les revendications 1 à 21, caractérisé en ce que la réaction entre le polymère et l'hémoglobine pendant un temps inférieur à celui entraînant au plus environ 5 % de méthémoglobine, de préférence pendant au plus 10 h, et à une température permettant une conservation correcte de l'hémoglobine, par exemple entre  $3^\circ\text{C}$  et  $30^\circ\text{C}$ .

23. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 22 de conjugués d'hémoglobine dans lesquels les sites Z sont reliés au polymère par l'intermédiaire d'une liaison ester, caractérisé en ce que :

- dans une première étape, on fait réagir les sites Z sous forme anhydride, notamment du benzène 1,2,4,5 tetracarboxylique dianhydride ou du benzène 1,2,4 tricarboxylique anhydride, sur un polymère comportant des fonctions OH, notamment du dextrane ou du polyéthylèneglycol, dans un milieu dans lequel le polymère est soluble, pour fixer les sites Z sur le polymère;

- dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans un milieu non déoxygené, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygenée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine.

24. Conjugué macromoléculaire caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé selon la revendication 3.

25. Conjugué macromoléculaire hydrosoluble d'hémoglobine, non biodégradable ou peu biodégradable, pendant le temps durant lequel le conjugué macromoléculaire doit assurer des fonctions oxyphoriques dans le plasma, présentant pour l'oxygène une affinité inférieure à celle de l'hémoglobine libre, caractérisé en ce qu'il est constitué :

- d'une part par de l'hémoglobine, laquelle peut passer de façon réversible de la forme déoxygénée à la forme oxygénée, 5
- d'autre part par un polymère P hydrosoluble, non toxique, de préférence non antigénique, hémocompatible, de masse moléculaire d'environ 1 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 1 000 à environ 100 000, comportant des groupes polaires, de préférence des groupes hydroxyles, carboxyliques ou amines, 10
- lequel polymère comporte un ou des sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par au moins un groupe choisi parmi les groupes suivants: sulfate, phosphate, carboxylate, et destinée à créer une liaison ionique avec le polymère, et contenant d'autre part au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH, destiné à créer une liaison covalente avec l'hémoglobine,
- le polymère P étant relié à l'hémoglobine 15
- . d'une part par l'intermédiaire d'au moins une liaison ionique établie entre l'une au moins des charges négatives des sites Z portés par le polymère P et l'hémoglobine, et
- . d'autre part par l'intermédiaire d'au moins une liaison covalente établie, entre l'un au moins des groupes carboxylique, aldéhyde ou OH des susdits sites Z portés par le polymère P et l'hémoglobine,
- le nombre de liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine étant tel que le conjugué macromoléculaire a une masse moléculaire moyenne d'environ 70 000 à environ 1 000 000, de préférence d'environ 70 000 à environ 500 000, la relation entre le nombre et la nature des charges négatives, le nombre de sites et le nombre de monomères étant la suivante :
- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un site tous les onze monomères, 25
- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un carboxylate, non engagé dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,
- lorsque il s'agit de site Z contenant deux charges anioniques provenant de deux carboxylates, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un site Z tous les six monomères. 30

26. Conjugué macromoléculaire selon la revendications 25, caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre au moins un groupe carboxylique ou aldéhyde ou OH porté par les sites Z et au moins une amine de l'hémoglobine située dans le site allostérique de l'hémoglobine, notamment l'amine de l'une au moins des deux valines  $\beta$ -terminales de l'hémoglobine. 35

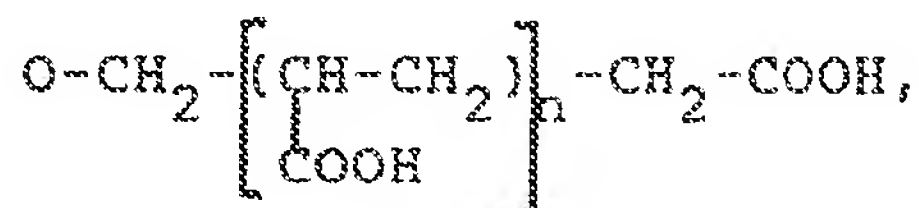
27. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 et 26, caractérisé en ce que les ponts salins entre les groupes  $\text{NH}_3^+$  et les groupes  $\text{COO}^-$  internes de l'hémoglobine sont intacts lorsque l'hémoglobine est sous forme déoxygénée. 35

28. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 26 et 27, caractérisé en ce que le polymère P est choisi parmi les polysaccharides, notamment les hydroxyalkylamidons dont la radical alkyle comporte de 2 à 4 atomes de carbone, l'inuline, le dextrane et ses dérivés, notamment le dextrane aminé, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthacrylate et ses dérivés, les polypeptides, les polyalkylène glycols dans lesquels le groupe alkylène comporte de 2 à 5 atomes de carbone, notamment le polyéthylène glycol et le polypropylène glycol. 40

29. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 à 28, caractérisé en ce que le polymère P a une masse moléculaire moyenne inférieure ou égale à 70 000, lorsqu'il est constitué par le dextrane et ses dérivés, et une masse moléculaire inférieure ou égale à 10 000 lorsqu'il est choisi parmi les polyalkylène glycols, la polyvinylpyrrolidone ou le polyméthylacrylate. 45

30. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 à 29, caractérisé en ce que le site Z est relié au polymère par l'intermédiaire d'une fonction ester, éther, amide ou amine. 50

31. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 à 30, caractérisé en ce que le site Z comporte des groupes  $\text{OSO}_3\text{H}$ ,  $\text{OPO}_3\text{H}_2$ ,  $\text{O-CH}(\text{COOH})_2$ ,  $\text{-O-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-COOH}$ , 50



n variant de 1 à environ 4, ou provient du pyridoxalsulfate, du pyridoxalphosphate, de l'adénosine triphosphate, de la phosphotyrosine, de la phosphosérine, de l'inositolhexasphosphate et ses dérivés, d'acide polycarboxylique contenant de 2 à 10 atomes de carbone sur la chaîne principale, de l'acide benzèncarboxylique comportant au moins trois fonctions carboxyliques, du 2,3 diphosphoglycérate. 60

32. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 à 31, caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine sont établies à partir des groupes carboxyliques provenant des sites Z fixés sur le polymère et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine. 65

33. Conjugué macromoléculaire selon les revendications 25 à 32, caractérisé en ce que les liaisons 65



ioniques entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre les groupes carboxylates des sites Z et l'hémoglobine.

34. Conjugué macromoléculaire dans lequel le polymère est du dextrane de masse moléculaire d'environ 10 000, les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire du groupe carboxylate du benzènedicarboxylate fixé sur le polymère, non engagé dans la liaison entre le benzène 1,2,4-tricarboxylique anhydride et le polymère,

- les liaisons covalentes étant établies entre l'autre groupe carboxylique du benzène-dicarboxylate - à la fois non engagé dans la liaison entre le benzène-1,2,4-tricarboxylique anhydride et le polymère et non engagé dans la liaison ionique définie ci-dessus - et des groupes  $\text{NH}_2$  de l'hémoglobine, le nombre de groupes benzènedicarboxylates étant d'environ 1 tous les dix monomères.

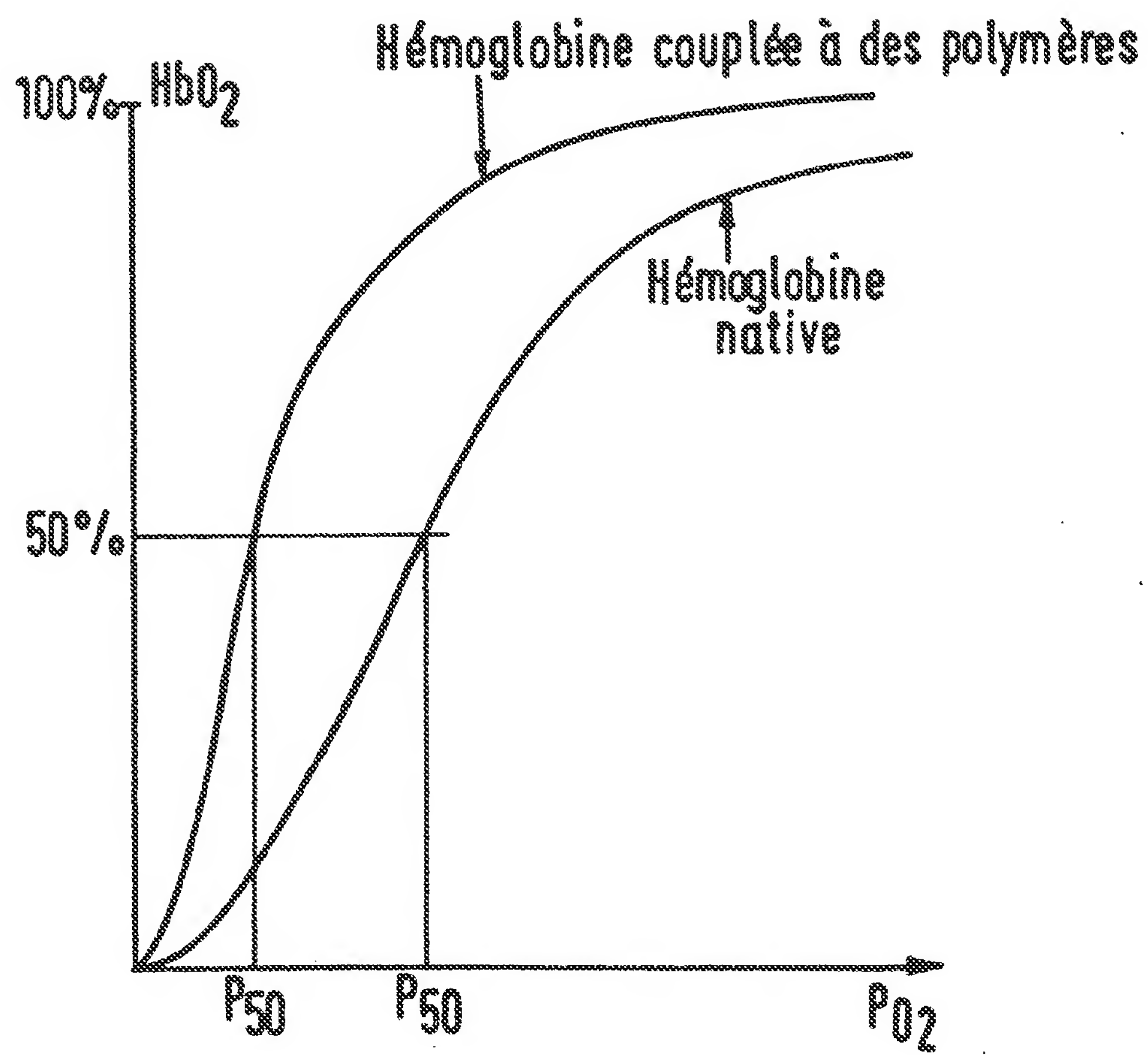


FIG.1



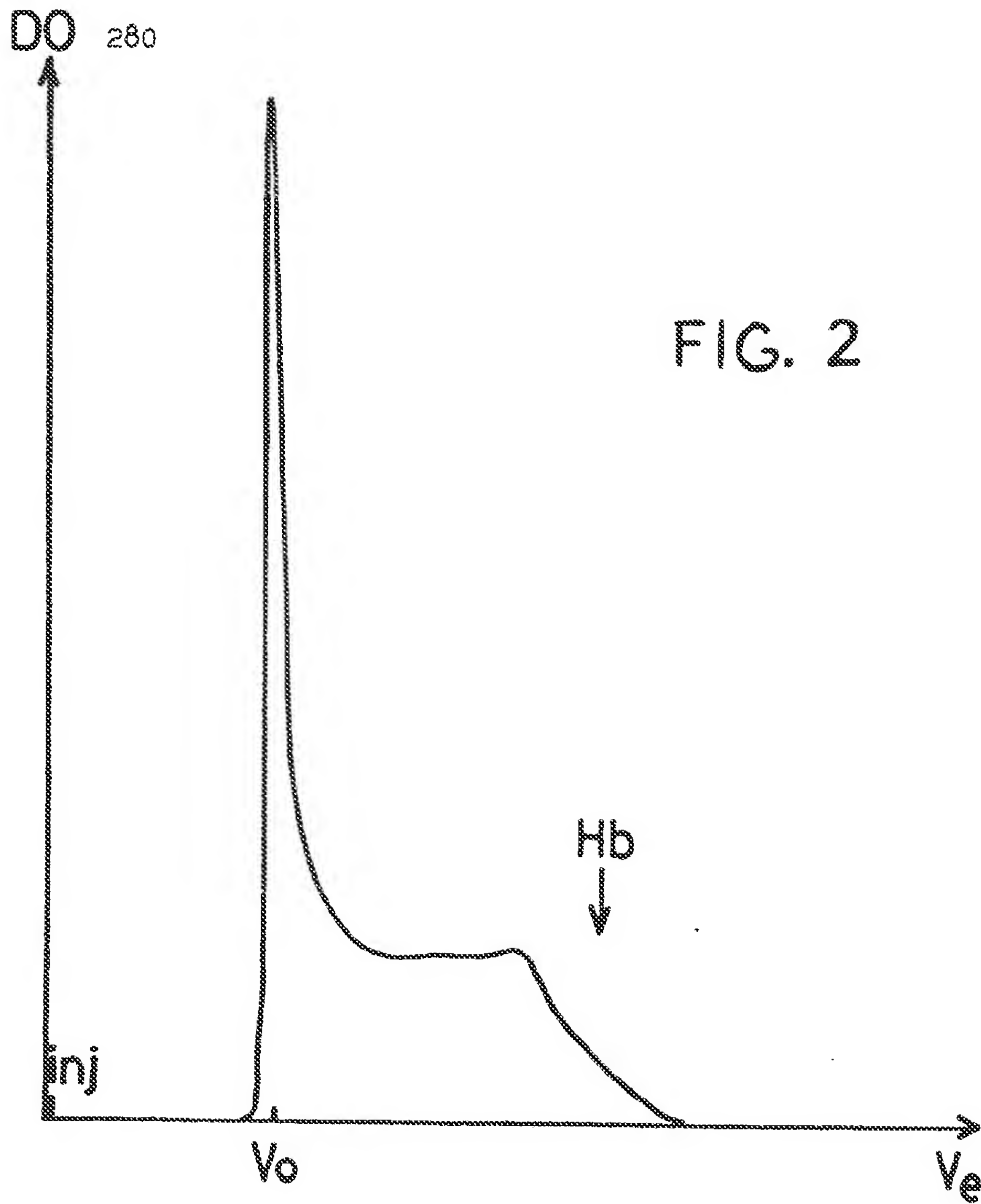


FIG. 2

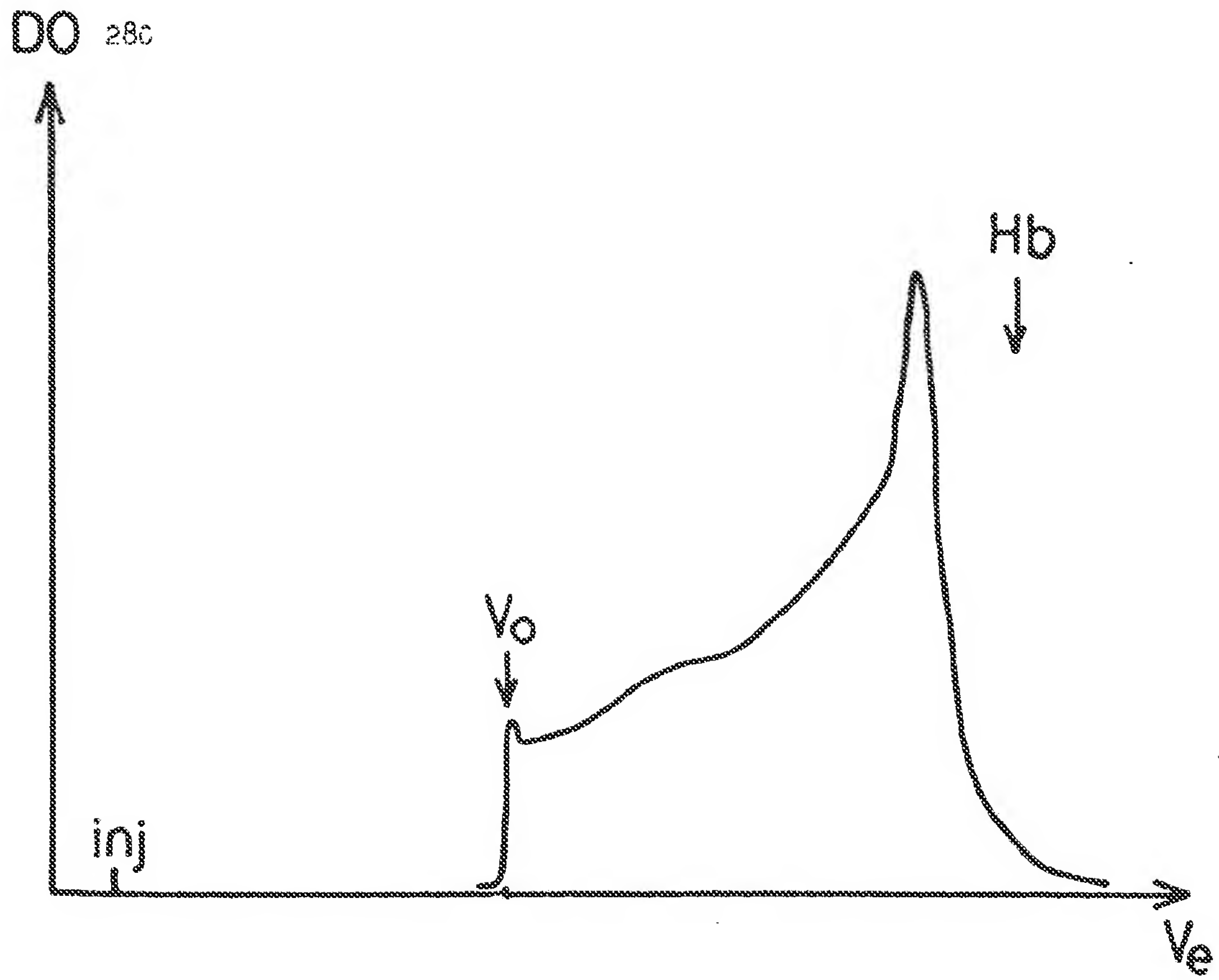
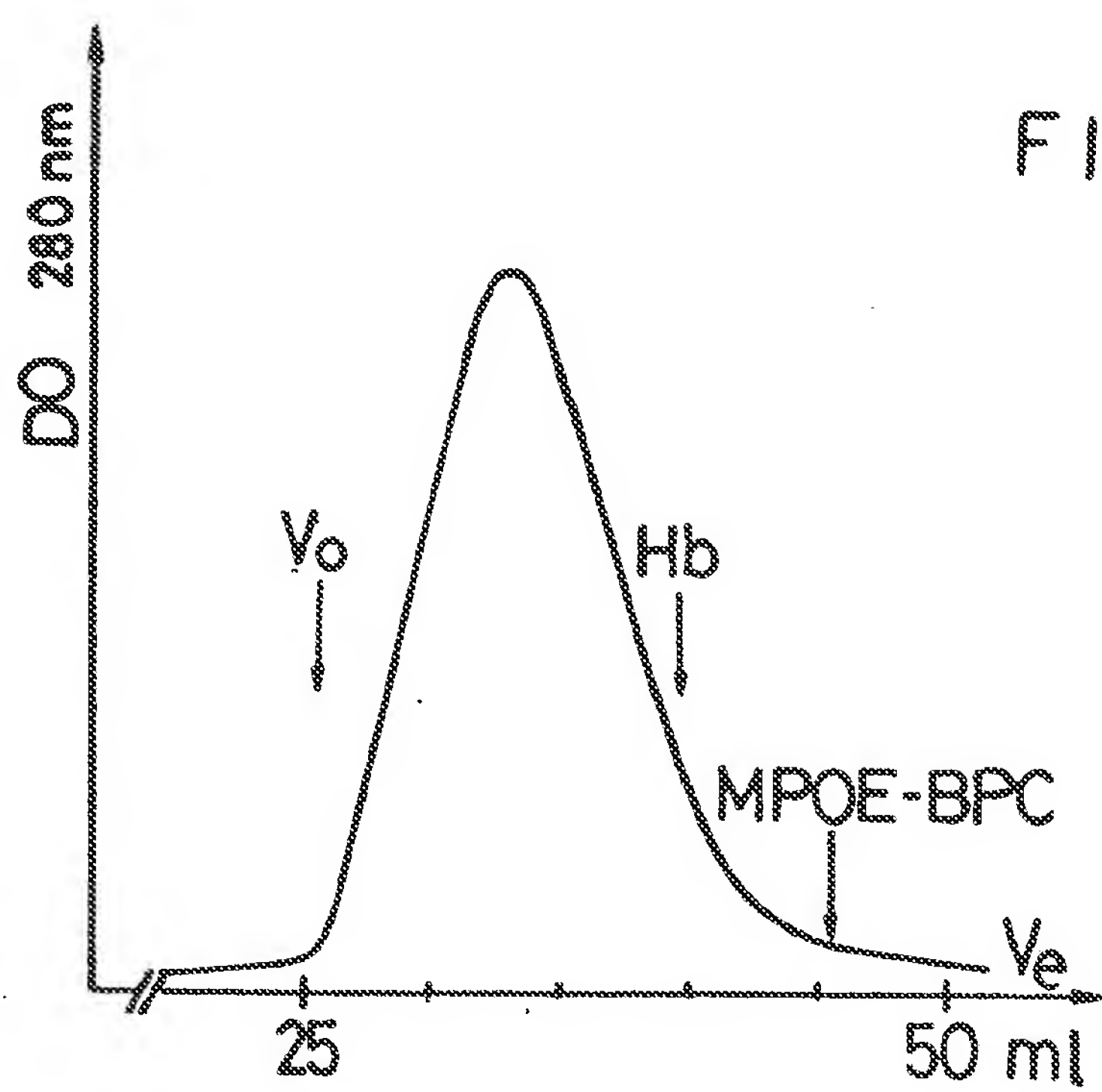


FIG. 3







Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 40 1076

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y,D	FR-A-2 600 894 (CNRS) * Page 2 ligne 1 - page 34, ligne 24 * ----	1-31	A 61 K 37/14
Y,D	FR-A-2 551 660 (CNRS) * Page 20, ligne 1 - page 22, ligne 11 * ----	1-31	
A,D	FR-A-2 328 478 (JEFFREY TZE-FEI WONG) ----		
A	DE-A-3 501 349 (BATTELLE-INSTITUT E.V.) ----		
A	EP-A-0 140 640 (FISONS PLC) -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 03-07-1989	Examineur TURMO Y BLANCO C.E.
<div>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</div> <div><div><div>X : particulièrement pertinent à lui seul</div><div>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</div><div>A : arriere-plan technologique</div><div>O : divulgation non-écrite</div><div>P : document intercalaire</div></div><div><div>T : théorie ou principe à la base de l'invention</div><div>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</div><div>D : cité dans la demande</div><div>L : cité pour d'autres raisons</div><div>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</div></div></div>			

EPF FORM 1503 01.82 (P0402)